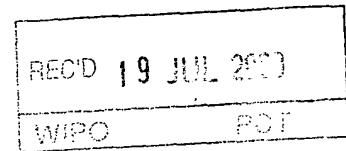


10/019963
PCT/EP 00/04972

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



4

Bescheinigung

EP 00/4972

Die Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG in Frankfurt am Main/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Neue Antimycotika und Fungizide, Verfahren zu deren Her-
stellung und Verwendung"

am 5. Juli 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 27. April 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Frank

Aktenzeichen: 199 30 959.0

Neue Antimycotika und Fungizide, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Antimycotika und Fungizide erhältlich aus Hefe, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung.

Selektive Antimycotika haben größte Bedeutung, da Pilz- und/oder Hefe-bedingte Infektionen beim Menschen in den letzten Jahren stark zugenommen haben und ebenfalls in Lebens- und Futtermittel immer wieder zu unerwünschten Kontamination führen. Besonders schwerwiegende Folgen haben Mycosen bei immunsupprimierten Patienten, deren zelluläres und humorales Abwehrsystem auf einem nicht voll funktionstüchtigen Niveau gehalten werden muß [Anaissie, 1992; Meunier *et al.*, 1992; Wingard, 1995]. Extrem Mycose-gefährdet sind HIV-1-infizierte Personen (AIDS), die im fortgeschrittenen Krankheitsstadium sehr häufig an opportunistischen Infektionen durch Human-pathogene Pilze und/oder Hefen sterben [Levy, 1993]. Die gegenwärtig zur Therapie solcher Infektionen eingesetzten Antimycotika (wie Amphoterizin B, Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol) besitzen beträchtliche Nebenwirkungen, da sie die strukturelle Integrität der eukaryotischen Cytoplasmamembran zerstören und dadurch ebenfalls den infizierten Wirtsorganismus schädigen [Hector, 1993]. Die Applikation herkömmlicher Antimycotika hat zudem in nur kurzer Zeit zu einer rapiden Zunahme an Fluconazol-Resistenzen geführt, die sich unter den humanpathogenen Mikroorganismen rasch ausbreiten und ein immer größer werdendes Problem darstellen [Cameron *et al.*, 1993; Chavenet *et al.*, 1994; Maenza *et al.*, 1994; Rex *et al.*, 1995; Troillet *et al.*, 1993]. Es ist daher ein Wunsch, Antimycotika zu entwickeln, die sich - ähnlich wie bakterielle Antimycotika durch hohe Selektivität auszeichnen und möglichst nur humanpathogene Pilze und Hefen angreifen. Da jedoch die Mehrheit aller zellulären Prozesse bei höheren Organismen von Genprodukten gesteuert wird, die bei Eukaryoten ein hohes Maß an funktioneller Homologie zeigen, ist es bislang nicht gelungen,

eingeschränkte Wirkspektrum beruht darauf, daß die bislang charakterisierten Killertoxine der Bäckerhefe mit unterschiedlichen Rezeptor-Populationen auf den Ebenen von Hefezellwand und Cytoplasmamembran interagieren müssen, um eine sensitive Zielzelle abtöten zu können. Bei den primären Toxinrezeptoren der Hefezellwand handelt es sich entweder um stark verzweigte β -1,6-D-Glukane oder um die äußeren Mannotriose-Seitenketten eines Zellwand-Mannoproteins [Bussey, 1991; Schmitt & Radler 1987, 1988].

Bei viralen Proteintoxinen der Hefen *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces bailli* und *Ustilago maydis*, wurden Killerstämme auch in den Gattungen *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis* und *Williopsis* beschrieben [McCracken *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996; Schmitt & Neuhausen, 1994; Walker *et al.*, 1995]. Die genetische Grundlage des Killerphänomens beruht in diesen Hefen jedoch nicht auf viralen Genomen, sondern entweder auf linearen dsDNA-Plasmiden oder auf chromosomalen Hefegenen [Schröder *et al.*, 1994].

Intensive molekularbiologische Untersuchungen verschiedener Toxinproduzierender "Killerhefen" haben gezeigt, daß die Sekretion toxischer Proteine ("Killertoxine") bei Hefen weitverbreitet ist und ein nicht zu unterschätzendes Potential bei der Entwicklung selektiver Antimycotika darstellt [Walker *et al.*, 1995; Hodgson *et al.*, 1995; Polonelli *et al.*, 1986; Schmitt & Neuhausen, 1994; Neuhausen & Schmitt, 1996; Schmitt *et al.*, 1997], jedoch konnten solche Proteintoxine bisher nicht bereitgestellt werden.

Daher ist es Aufgabe dieser Erfindung geeignete hochwirksame Proteintoxine mit antimycotischer oder fungizider Wirkung zur Bekämpfung von human und pflanzenpathogenen Hefen und/oder Pilzen bereitzustellen.

In überraschender Weise erweist sich nunmehr das hochwirksam produzierte und sezernierte Killertoxin WICALTIN (auch Proteintoxin) aus der Wildtyphefe *Williopsis californica* Stamm 3/57 (DSM 12865) und das viruskodierte ZYGOCIN (auch Pro-

"spezifisch-antifungale Antibiotika" zu entwickeln [Kurz, 1998; Komiyama *et al.*, 1998].

Ein *target* von selektiven Antimycotika sind die β -1,3-D-Glukane der Hefezellwand, die für die mechanische und osmotische Stabilität der Zelle unerlässlich sind, jedoch in höheren Eukaryoten nicht vorkommen und daher als "Achillesverse" bei der Bekämpfung pathogener Hefen genutzt werden könnten [Roemer *et al.*, 1994]. Obwohl Substanzen, die selektiv in die Zellwandstruktur von Hefen und Pilzen eingreifen, somit von großem Interesse sind, wurden bislang noch keine Antibiotika-ähnlichen Hemmstoffe zur Behandlung von Mycosen eingesetzt. Während bakterielle Antibiotika-Produzenten bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts entdeckt wurden, konnten ähnliche Effekte bei Hefen erst Anfang der Sechziger Jahre mit der Identifizierung sogenannter "Killer"-Hefen beobachtet werden [Bevan & Makower, 1963]: Toxinproduzierende "Killer"-Stämme der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* produzieren und sezernieren sogenannte "Killertoxine" bezeichneten Proteine, welche sensitive Hefen in einem Rezeptor-abhängigen Prozeß abtöten [Bussey, 1991; Tipper & Schmitt, 1991]. Die Fähigkeit zur Toxinproduktion beruht bei *S. cerevisiae* auf einer Infektion mit Reovirus-ähnlichen Doppelstrang-RNA-Viren, die im Cytoplasma der Hefe stabil und in hoher Kopienzahl persistieren, ohne die eukaryotische Wirtszelle in erkennbarer Weise zu schädigen [Tipper & Schmitt, 1991]. Bei den drei bislang bekannten Killertoxinen (K1, K2, K28) der Hefe *S. cerevisiae* handelt es sich um nicht-glykosylierte α/β -Heterodimere, die von der infizierten Zelle als höhermolekulare Präprototoxine translatiert und auf dem intrazellulären Sekretionsweg durch komplexe Modifikationen zu den biologisch aktiven Killerproteinen prozessiert werden [Hanes *et al.*, 1986; Dignard *et al.*, 1991; Schmitt & Tipper, 1995]. Die toxische Wirkung der *S. cerevisiae* Toxine beruht entweder auf einer Zerstörung der Membraintegrität (Toxine K1, K2) oder (wie im Falle von Killertoxin K28) auf einem Zellzyklus-Arrest mit gezielter Hemmung der DNA-Synthese [Bussey, 1991; Schmitt & Compain, 1995; Schmitt *et al.*, 1996]. Obwohl sich Killertoxine der Klassen K1, K2 und K28 in ihren Wirkungsweisen und physikochemischen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden, ist ihnen gemeinsam, daß sie enge Wirkungsspektren besitzen und überwiegend sensitive Hefen nahe verwandter Arten abtöten. Dieses

teintoxin) der Hefe *Zygosaccharomyces bailli* (DSM 12864) als besonders geeignet zur Bekämpfung von human- und pflanzenpathogenen Hefen und/oder Pilzen. Zudem können im Lebens- und Futtermittelbereich gefürchtete Schadhefen und Pilze abgetötet werden. Beide Proteintoxine besitzen daher das Potential als Antimycotikum und/oder Fungizid zur Bekämpfung von Hefe und/oder Pilzinfektionen, insbesondere Mycosen, eingesetzt zu werden. Diese Indikationen werden in der vorliegenden Erfindung durch Untersuchungen zur Wirkungsweise verifiziert. Die Toxine werden im Rahmen dieser Erfindung geeignet kloniert und sequenziert und somit wird ein Verfahren für die gentechnische Herstellung und Überexpression in Kultur von WICALTIN und ZYGOCIN etabliert.

Ein Gegenstand der Erfindung betrifft daher Proteintoxine erhältlich aus *Williopsis californica*, besonders bevorzugt der Stamm DSM 12865 und *Zygosaccharomyces bailli*, besonders bevorzugt der Stamm DSM 12864. Beide Stämme wurden am 09. Juni 1999 am DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, in 38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b nach dem Budapestervertrag hinterlegt (www.dsmz.de).

Im Rahmen dieser Erfindung sezernieren insbesondere DSM 12864 und DSM 12865 biologisch hochwirksame Proteintoxine, die aufgrund ihres breiten Wirkspektrums (siehe Beispiel 4 und 7) auch zahlreiche human- und pflanzenpathogene Hefen und Pilze abtöten. Daher betrifft die Erfindung auch selektive Antimycotika oder Fungizide, in dem Sinne, daß es sich bei den Proteintoxinen - und den nachstehenden erfindungsgemäßen Polypeptiden und deren kodierenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, insbesondere in der funktionellen Einheit eines Toxingens - um potentielle Bio-Pharmaka handelt, die aufgrund ihrer spezifischen, rezeptorvermittelten Wirkung ausschließlich Hefen und / oder Pilze abtöten und für höhere Eukaryoten - und damit ebenfalls für den Menschen und Säugetierzellen - sowie Pflanzen, vorzugsweise Kulturpflanzen, völlig ungefährlich sind [Vgl. Pfeiffer *et al.*, 1988].

Folgende human- und pflanzenpathogene sowie apathogene Hefen und / oder Pilze können selektiv abgetötet werden:

Zygocin-sensitive Hefearten: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida vini*, *Hanseniaspora uvarum*, *Debaryomyces hansenii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala*, *Pichia jadinii*, *Pichia membranefaciens*, *Yarrowia lipolytica* und *Zygosaccharomyces rouxii*.

Wicaltin-sensitive Hefearten: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia anomala*, *Pichia jadinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporothrix spec.*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora pretoriensis*, *Yarrowia lipolytica* und *Zygosaccharomyces bailii*.

Die besonders starke Aktivität des Wicaltin-produzierenden Hefestammes DSM 12865 beruht vermutlich auf dessen ausgeprägter Sekretionseffizienz, die im Vergleich zu anderen Stämmen der gleichen Hefeart deutlich stärker ausgeprägt ist. Die 'Killer'-Eigenschaft des Zygocin-produzierenden Hefestammes DSM 12864 beruht auf einer Infektion mit toxin kodierenden Doppelstrang-RNA-Viren (Mz-dsRNA), die stabil und in hoher Kopienzahl im Cytoplasma persistieren und die betreffende Hefe (Stamm DSM 12864) zur Produktion und Sekretion von Zygocin befähigen [Vgl. Schmitt & Neuhausen, 1994]. Andere Stämme der gleichen Art zeigten keine Toxinproduktion, da sie keine toxin kodierenden dsRNA-Viren im Cytoplasma beherbergen und somit phänotypisch als 'Nicht-Killer' zu klassifizieren sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Nukleinsäuren kodierend für ein Proteintoxin - mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 und No 2 und einer Glucanase-Aktivität - oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 100 Nukleotiden, vor allem mit mindestens 100 Nukleotiden (nachfolgend "erfindungsgemäße Nukleinsäure(n)" genannt).

Die vollständigen Nukleinsäuren kodieren für Proteintoxine, die nach intrazellulärer Prozessierung und Sekretion eine Größe von 309 Aminosäuren und eine molekulare Masse von 34 kDa (SEQ ID No 1) bzw. von 99 Aminosäuren und eine molekulare

Die Teile der erfindungsgemäßen Nukleinsäure können beispielsweise zur Herstellung einzelner Epitope, als Sonden zur Identifizierung weiterer funktioneller Varianten oder als Antisense-Nukleinsäuren verwendet werden. Beispielsweise eignet sich eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 8 Nukleotiden als Antisense-Nukleinsäure, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 15 Nukleotiden als Primer beim PCR-

Verfahren, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20 Nukleotiden für die Identifizierung weiterer Varianten und eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 100 Nukleotiden als Sonde.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine Poly(A)-Sequenz, eine oder mehrere (für die intrazelluläre Pro-Protein-Prozessierung notwendige) Kex2p Endopeptidase Erkennungssequenzen sowie eine oder mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die nicht-kodierenden Sequenzen sind regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression des kodierenden Toxins, enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise im Falle der Nukleinsäure nach SEQ ID No 2 prokaryotische und/oder eukaryotische Expressionsvektoren bzw. im Falle der Nukleinsäure nach SEQ ID No 1 ausschließlich eukaryotische Expressionsvektoren sein. Die Expression der toxin kodierenden Nukleinsäure nach SEQ ID No 1 in *Escherichia coli* ist nicht möglich, da das betreffende, heterolog exprimierte Proteintoxin für die Bakterienzelle toxisch ist. Eine Klonierung der WICALTIN-kodierenden Nukleinsäure nach SEQ ID No 1 ist in *E. coli* nur mit Plasmiden möglich, die keinen Promotor tragen (z.B. mit Hilfe von Derivaten des Plasmids pBR322). Ein Beispiel für einen prokaryotischen Vektor, der eine heterologe Expression der ZYGOCIN-kodierenden Nukleinsäure nach SEQ ID No 2 erlaubt, ist

Masse von 10 kDa auf (SEQ ID No 2). Die Expression der Nukleinsäure nach SEQ ID No 1 in der Hefe resultiert in einem rekombinanten WICALTIN, das als glykosyliertes Protein mit signifikanter β -1,3-D-Glucanase-Aktivität in den Kulturüberstand der Hefe sezerniert wird [Vgl. Beispiel 10]. Weitere Experimente gemäß der vorliegenden Erfindung bestätigten, daß es sich bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren um Nukleinsäuren handelt, die im Falle von SEQ ID No 1 für ein Proteintoxin mit Glucanase - Aktivität und im Falle von SEQ ID No 2 für ein in vivo vermutlich O-glykosyliertes, als ZYGOCIN bezeichnetes Proteintoxin kodieren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind erhältlich aus DSM 12865 (SEQ ID No 1) und DSM 12864 (SEQ ID No 2).

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, und insbesondere eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 von Pos. 1 bis Pos. 947 und gemäß SEQ ID No 2 von Pos. 1 bis Pos. 713. Die beiden Positionen bestimmen gemäß der vorliegenden Erfindung den Start und das Ende des kodierenden Bereiches, d.h. die jeweils erste und letzte Aminosäure des betreffenden Leserahmens.

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die funktionell mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren verwandt sind. Beispiele verwandter Nukleinsäuren sind beispielsweise Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Hefezellen bzw. Stämmen und Kulturen oder allelischen Varianten. Ebenfalls umfaßt die vorliegende Erfindung Varianten von Nukleinsäuren, die von verschiedenen Hefen / Hefestämmen oder anderen Infektionserregern wie Dermatophyten und Schimmelpilzen (gemäß dem DHS-System) stammen können.

Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff "Varianten" gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 60%, vorzugsweise von ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweisen.

der kommerziell erhältliche Vektor pGEX-4T-1, der in *E. coli* die Expression eines Gluthation-S-Transferase-ZYGOCIN-Fusionsproteins erlaubt. Ein weiterer Vektor für die Expression von ZYGOCIN in *E. coli* ist z.B. der T7 Expressionsvektor pGM10 (Martin, 1996), welcher für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodiert, der eine vorteilhafte Reinigung des exprimierten Proteins über eine Ni^{2+} -NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767), für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren, welche allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die Wirtszelle geeignete regulatorische Sequenzen, wie z.B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (s. z.B. EP-B1-0154133), den ADH-2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (s. z.B. EP-B1-0127839) oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z.B. von MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus; Lee et al. (1981) Nature, 214, 228).

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, oder Adenoassoziierte Virusvektoren, z.B. ein Adenoassoziiierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei insertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

Geeignete Adenovirusvektoren sind beispielsweise in McGrory, W.J. et al. (1988) Virol. 163, 614; Gluzman, Y. et al. (1982) in "Eukaryotic Viral Vectors" (Gluzman, Y. ed.) 187, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Chroboczek, J. et al. (1992) Virol. 186, 280; Karlsson, S. et al. (1986) EMBO J. 5, 2377 oder WO95/00655 beschrieben.

Geeignete Adeno-assoziierte Virusvektoren sind beispielsweise in Muzyczka, N. (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158, 97; WO95/23867; Chiorini, J.A. et al. (1994) Gene Therapy 6, 1531 oder Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5, 793 beschrieben.

Gen therapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert. Hierzu eignen sich Lipidmischungen wie bei Felgner, P.L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413; Behr, J.P. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982; Felgner, J.H. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550 oder Gao, X. & Huang, L. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1189, 195 beschrieben. Bei der Herstellung der Liposomen wird die DNA ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die DNA vollständig von den Liposomen komplexiert wird.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor zur Herstellung von transgenen Pflanzen, enthalten. Da die beschriebenen Killertoxine WICALTIN und ZYGOCIN ein breites Wirkungsspektrum besitzen und auch pflanzenpathogene Hefen und Pilze abtöten, ist es möglich transgene Pflanzen bereitzustellen, die sich beispielsweise gegenüber einer Infektion mit dem Mais-pathogenen Erreger *Ustilago maydis* resistent verhalten. Ähnliche Versuche wurden bereits an Tabak-Pflanzen durchgeführt, die durch heterologe Expression des natürlicherweise viral kodierten Killertoxins KP4 von *U. maydis* in der Lage waren, das betreffende Proteintoxin zu sezernieren und dadurch einen spezifischen Schutz gegen Infektionen mit bestimmten phytopathogenen Stämmen von *U. maydis* aufbauten (Park et al., 1990; Park et al., 1995; Bevan, 1984). Aufbauend auf kommerziell erhältlichen Transkriptionssystemen, die auf modifizierten Derivaten des natürlichen Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* beruhen, können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ebenfalls repräsentiert in den Toxingenen WCT und ZBT, in sogenannte bidirektionale pBI-Vektoren (Fa. CLONTECH) inkloniert und zur Herstellung transgener Pflanzen eingesetzt werden. Die betreffenden Toxingene WCT und ZBT werden hierzu unter Transkriptionskontrolle des starken Blumenkohl-

sind, d.h. eine Glucanase-Aktivität aufweisen. Unter Varianten versteht man auch allelische Varianten oder Polypeptide, die von verschiedenen Hefen / Hefestämmen oder anderen Infektionserregern wie Dermatophyten, Schimmelpilzen (gemäß dem DHS-System) stammen können.

Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß Figur 2 haben. Ferner zählen hierzu auch Deletion des Polypeptids im Bereich von ca. 1 - 60, vorzugsweise von ca. 1 - 30, insbesondere von ca. 1 - 15, vor allem von ca. 1 - 5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion einer Glucanase haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-humanen Sequenzen von ca. 1 - 200, vorzugsweise ca. 1 - 150, insbesondere ca. 1 - 100, vor allem ca. 1 - 50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-humanen Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, z.B. aus der Galactosidase von *E. coli* oder ein sogenannter Histidin-Tag, z.B. ein Met-Ala-His-Tag. Ein Fusionsprotein mit einem sogenannten Histidin-Tag eignet sich besonders vorteilhaft zur Reinigung des exprimierten Proteins über Metallionen-haltige Säulen, beispielsweise über eine Ni²⁺-NTA-Säule. "NTA" steht für den Chelator "nitrilotriacetic acid" (Qiagen GmbH, Hilden). Insofern umfaßt die Erfindung auch solche erfindungsgemäße Polypeptide die maskiert sind, im Sinne eines Proteins oder im weitesten Sinne als *Pre-drug*.

Die Teile der erfindungsgemäßen Polypeptide repräsentieren beispielsweise Epitope, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden können.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide werden beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden

Mosaikvirus-Promotors (CaMV-P) gebracht. Der genauere Aufbau der zu konstruierenden Vektoren ist in Figur 9 schematisch dargestellt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise chemisch anhand der SEQ ID No 1 und No 2 offenbarten Sequenzen oder anhand der in SEQ ID No 1 und No 2 offenbarten Peptidsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes z.B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z.B. Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, No. 4). Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäße Nukleinsäure in die Hand zu bekommen, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank anhand einer geeigneten Sonde (s. z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 1000 Nucleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200 bis 500 Nucleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300 bis 400 Nucleotiden, deren Sequenz aus der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 und No 2 abgeleitet werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die Polypeptide als solche mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 und No 2 oder einer funktionellen Variante davon, und Teile davon mit mindestens sechs Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 12 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 65 Aminosäuren und vor allem mit 309 Aminosäuren (SEQ ID No 1) und mit 99 Aminosäuren (SEQ ID No 2) (nachfolgend "erfindungsgemäße Polypeptide" genannt). Beispielsweise kann ein ca. 6-12, vorzugsweise ca. 8 Aminosäuren-langes Polypeptid ein Epitop enthalten, das nach Kopplung an einen Träger zur Herstellung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper dient (siehe hierzu z. B. US 5,656,435). Polypeptide mit einer Länge von mindestens ca. 65 Aminosäuren können auch direkt ohne Träger zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörper dienen.

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Peptid verwandt

hergestellt. Als Wirtzellen zur Herstellung korrekt prozessierter und damit biologisch aktiver Proteintoxine eignen sich ausschließlich eukaryotische Organismen, vorzugsweise die Sproßhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*.

Insbesondere die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Memfield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und gegebenenfalls isoliert wird.

Ganz besonders bevorzugt ist die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, da sich diese Hefe natürlicherweise WICALTIN- und ZYGOCIN-resistent verhält und bereits mehrfach erfolgreich zur heterologen Expression von Fremdproteinen eingesetzt wurde (Giga-Hama & Kumagai (1997), in "Foreign Gene Expression in Fission Yeast: *Schizosaccharomyces pombe*", Springer Verlag). Wie in Beispiel 11 ausgeführt, können die toxinkodierenden Nukleinsäuren nach SEQ ID No 1 und SEQ ID No 2 beispielsweise in den *S. pombe* Vektor pREP1 inkloniert werden [Maundrell (1990), J. Biol. Chem. 265:10857-10864], in dem sie unter Transkriptions-Kontrolle des Thiamin-regulierten *nmt1* Promotors der Spaltheife stehen [*nmt* = "no message with thiamine"] Hefen, die mit einem solchen Vektor transformiert werden, exprimieren das betreffende Fremdgen in Abhängigkeit von der jeweiligen Thiamin-Konzentration im Kulturmedium der Hefe. Hierdurch läßt sich gegebenenfalls die Phase des Hefewachstums von der Phase der Produktion des Fremdproteins zeitlich trennen, so daß es prinzipiell auch möglich ist, für die Hefe toxische Proteine zur Expression zu bringen. Um gleichzeitig eine Sekretion und damit eine deutlich leichtere Reinigung der in *S. pombe* heterolog exprimierten Toxine WICALTIN und

ZYGOCIN zu ermöglichen, haben wir bereits einen Expressions-Vektor konstruiert [Vektor pTZ19; siehe Beispiel 11], der das Sekretionsprozesssignal des viralen K28-Präprotoxins enthält [Schmitt & Tipper, 1995] und dadurch eine effektive Sekretion des jeweils 'in-frame' nachgeschalteten Fremdproteins ermöglicht.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Koppelung an geeignete Träger, wie z.B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon, gegebenenfalls in Anwesenheit von z.B. Freund's Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (s. z.B. Diamond, B.A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z.B. über Säulenchromatographie reinigen. Bevorzugt wird eine Affinitätsreinigung der Antikörper, bei der beispielsweise das jeweilige Antigen (ZYGOCIN oder WICALTIN) kovalent an eine allgemein erhältliche CnBr-aktivierte Sepharose-Matrix gekoppelt und zur Reinigung der jeweils toxinspezifischen Antikörper eingesetzt wird.

Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293 hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel, das die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die erfindungsgemäßen Polypeptide

Beispielsweise können gemäß der vorliegenden Erfindung anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ein Diagnostikum auf der Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR-Diagnostik, z.B. gemäß EP-0200362) oder eines Northern und/oder Southern Blots, wie in Beispiel 13 näher beschrieben, hergestellt werden. Diese Tests beruhen auf der spezifischen Hybridisierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit dem komplementären Gegenstrang üblicherweise der entsprechenden mRNA. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann hierbei auch modifiziert sein, wie in Beispiel 14 näher beschrieben. Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes DNA-Mittel geeigneter Reagenzien, z.B. radioaktiv mit α - 32 P-dATP oder nicht-radioaktiv mit Biotin, nach allgemein bekannten Methoden markiert und mit isolierter RNA, die vorzugsweise an geeignete Membranen aus z.B. Zellulose oder Nylon gebunden wurde, inkubiert. Zudem ist es vorteilhaft, die isolierte RNA vor der Hybridisierung und Bindung an eine Membran der Größe nach, z.B. mittels Agarose-Gelelektrophorese, aufzutrennen. Bei gleicher Menge an untersuchter RNA aus jeder Gewebeprobe kann somit die Menge an mRNA bestimmt werden, die spezifisch durch die Sonde markiert wurde.

Ein weiteres Diagnostikum enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunogenen Teile davon. Das Polypeptid bzw. Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z.B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit z.B. Blut, in vitro in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Antikörper reagieren zu können. Der Antikörper-Peptid-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, wie Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

Ein anderes Diagnostikum enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe des Menschen leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid vor-

(einzeln oder in Kombination) ebenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Mycosen, wie oberflächliche, kutane und subkutane Dermatomykosen, Schleimhaut- und Systemmykosen, besonders bevorzugt Candida-Mykosen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen formuliert wird.

In Beispiel 12 ist ausgeführt, dass das von Stamm DSM 12865 produzierte und gereinigte Toxin WICALTIN sogar eine deutlich stärkere Toxizität auf Hefen besitzt, als die im Vergleich getesteten und zur Therapie von Mycosen häufig eingesetzten, topischen Antimycotika Clotrimazol und Miconazol.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Arzneimittel im obigen Sinne enthaltend ein Antimycotikum oder ein Proteintoxin erhältlich aus DSM 12864 und/oder DSM 12865 und/oder erfindungsgemäße Polypeptide mit antimycotischer Wirkung.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen komplexierter Form enthält.

Als geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe eignen sich z.B. eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinaseinhibitoren, Nukleaseinhibitoren etc.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Diagnostikum enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe und ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Mycosen, wie oberflächliche, kutane und subkutane Dermatomykosen, Schleimhaut- und Systemmykosen, besonders bevorzugt Candida-Mykosen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen versetzt werden.

handen ist. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Peptid-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Fungizid das die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die erfindungsgemäßen Polypeptide (einzeln oder in Kombination) und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur Herstellung eines Fungizids zur Bekämpfung von Schadhefen und Schadpilzen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit landwirtschaftlich annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen formuliert wird.

Wie bereits beschrieben wird in einer bevorzugten Ausführungsform eine transgene Pflanze hergestellt, welche das erfindungsgemäße Proteintoxin exprimiert. Daher betrifft die Erfindung ebenfalls Pflanzenzellen sowie inhärent die transgene Pflanze als solche enthaltend die erfindungsgemäßen Polypeptide und/oder Proteintoxine.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft auch einen Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren, wie z.B. Inhibitoren oder Stimulatoren, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder die erfindungsgemäßen Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

Ein geeigneter Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren, insbesondere solcher, die in der sensitiven Hefezelle mit dem Proteintoxin ZYGOCIN nach SEQ ID No 2 wechselwirken, ist z.B. das sogenannte "Two-Hybrid System" (Fields, S. & Sternberg, R. (1994) Trends in Genetics, 10, 286). Bei diesem Test wird eine Zelle, beispielsweise eine Hefezelle, mit einem oder mehreren Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert, die ein Fusionsprotein exprimieren, das das erfindungsgemäße Polypeptid und eine DNA-Bindedomäne eines bekannten Proteins, beispielsweise von Gal4 oder LexA aus E. coli, enthält und/oder ein Fusionsprotein

exprimieren, das ein unbekanntes Polypeptid und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne, beispielsweise von Gal4, Herpes oder B42, enthält. Zudem enthält die Zelle ein Reporter-gen, beispielsweise das LacZ-Gen aus *E. coli*, "Green Fluorescence Protein" oder die Aminosäure-Biosynthesegene der Hefe His3 oder Leu2, das durch regulatorische Sequenzen, wie z.B. den *lexA*-Promotor/Operator oder durch eine sogenannte "Upstream Activation Sequence" (UAS) der Hefe kontrolliert wird. Das unbekannte Polypeptid wird beispielsweise durch ein DNA-Fragment kodiert, das aus einer Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, stammt. Üblicherweise wird gleich eine cDNA-Genbank mit Hilfe der beschriebenen Expressionsvektoren in Hefe hergestellt, so daß der Test unmittelbar danach durchgeführt werden kann.

Beispielsweise wird in einem Hefe-Expressionsvektor die erfindungsgemäße Nukleinsäure in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die *lexA*-DNA-Bindedomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und der *LexA*-DNA-Bindedomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. In einem anderen Hefe-Expressionsvektor werden cDNA-Fragmente aus einer cDNA-Genbank in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus einem unbekannten Polypeptid und der Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. Die mit beiden Expressionsvektoren transformierte Hefe, die beispielsweise Leu2⁺ ist, enthält zusätzlich eine Nukleinsäure, die für Leu2 kodiert, und durch den *LexA*-Promotor/Operator kontrolliert wird. Im Falle einer funktionellen Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und dem unbekannten Polypeptid bindet die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne über die *LexA*-DNA-Bindedomäne an den *LexA*-Promotor/Operator, wodurch dieser aktiviert wird und das Leu2-Gen exprimiert wird. Dies hat zur Folge, daß die Leu2⁺ Hefe auf einem Medium, das kein Leucin enthält, wachsen kann.

Bei Verwendung des LacZ- bzw. "Green Fluorescence Protein"-Reportergens anstelle eines Aminosäure-Biosynthesegens kann die Aktivierung der Transkription dadurch nachgewiesen werden, daß sich blau- bzw. grün-fluoreszierende Kolonien

Zur Produktion des von DSM 12864 sezernierten Toxins ZYGOCIN kann synthetisches B-Medium eingesetzt werden (Vgl. Radler et al., 1993).

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung ohne die Erfindung auf diese Beispiele zu begrenzen.

Beispiele

Beispiel 1:

Anreicherung und Reinigung des anti-*Candida*-Toxins WICALTIN aus Kulturüberständen der Killerhefe *W. californica* Stamm 3/57 (DSM 12865)

Das von der Killerhefe *W. californica* 3/57 sezernierte Kilttoxigen WICALTIN zeigt im Agardiffusionstest auf Methylenblau-Agar gegen sensitive Hefen eine optimale Hemmwirkung bei pH 4,7 und 20°C. In synthetischem Flüssigmedium zeigt die Killerhefe *W. californica* Stamm 3/57 eine maximale Toxinproduktion bei Kultivierung in BAVC-Medium (pH 4,7). Zur Toxinanreicherung wurde die Killerhefe zunächst für 24 h in 5 ml YEPD-Medium bei 30°C unter Schütteln inkubiert, anschließend vollständig in 200 ml BAVC-Medium überführt und erneut 48 h bei 20°C auf dem Schüttler (140 Upm) kultiviert. Vier Hauptkulturen zu je 2,5 l BAVC-Medium (pH 4,7 in 5 l Erlenmeyer-Kolben) wurden mit der zweiten Vorkultur beimpft (1%-iges Inokulum) und fünf Tage bei 20°C unter leichtem Schütteln (80 Upm) bebrütet. Zur Konzentrierung des sezernierten Kilttoxins wurde der zellfreie Kulturüberstand bei +4°C und einem Druck von 1 bar durch Ultrafiltration an Polysulfonsäure-Membranen ("EasyFlow" [Fa. Sartorius]; Ausschußgrenze 10 kDa) 200-fach auf ein Volumen von 50 ml eingengt. Zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen und Entsalzung des so gewonnenen Konzentrates wurde das Toxin über Nacht bei +4°C im Dialyseschlauch (Ausschußgrenze 10-20 kDa) gegen 5 mM Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,7) dialysiert. Zur Lagerung des Toxinkonzentrates wurde das dialysierte Präparat über eine 0,2 µm Membran steriltfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

Nachweis und Eichung der Toxinaktivität erfolgten im Agardiffusionstest auf Methylenblau-Agar (MBA; pH 4,7) gegen die sensitive Indikatorhefe *Saccharomyces cerevisiae* 192.2d. Hierzu wurden vom Toxinkonzentrat logarithmische Verdünnungs-

bilden. Die Blau- bzw. Fluoreszenzfärbung läßt sich aber auch leicht im Spectrophotometer z.B. bei 625 nm im Falle einer Blaufärbung quantifizieren.

Auf diese Weise können Expressionsgenbanken leicht und schnell auf Polypeptide durchsucht werden, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid interagieren. Anschließend können die gefundenen neuen Polypeptide isoliert und weiter charakterisiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des "Two-Hybrid-Systems" ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem bekannten oder unbekannten Polypeptid durch weitere Substanzen, wie z.B. chemische Verbindungen. Auf diese Weise lassen sich auch leicht neue wertvolle chemisch synthetisierbare Wirkstoffe auffinden, die als Therapeutikum eingesetzt werden können. Die vorliegende Erfindung ist daher nicht nur auf ein Verfahren zum Auffinden von polypeptidartigen Interaktoren bestimmt, sondern erstreckt sich auch auf ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die mit dem oben beschriebenen Protein-Protein-Komplex interagieren können. Derartige peptidartige, wie auch chemische Interaktoren werden daher im Sinne der vorliegenden Erfindung als funktionelle Interaktoren bezeichnet, die eine inhibierende oder eine stimulierende Wirkung haben können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der Proteintoxine mittels Kultivierung und Sekretion der Proteintoxine in ein Medium, welches ein synthetisches Kultumedium (BAVC-Medium) darstellt, das eine chromatographische Reinigung der sezernierten Toxine wesentlich erleichtert (Vgl. Beispiel 1 sowie Anhang zu Beispielen). Im Falle des von Stamm DSM 12865 produzierten und sezernierten WICALTINS läßt sich eine weitere Steigerung in der Toxinproduktion erreichen, wenn das Medium durch Zusatz von des pflanzlichen (und allgemein erhältlichen) β-1,3-D-Glukans Laminarin in einer Endkonzentration von 1 % supplementiert wird. Wie in Beispiel 14 ausgeführt, führt der Zusatz von Laminarin zum Kultumedium zu einer Induktion der WICALTIN-Produktion, die durch Northern-Analysen auf eine Induktion der Transkription zurückgeführt werden konnte.

stufen in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,7) hergestellt und zu jeweils 100 µl in zuvor ausgestanzte Löcher (Lochdurchmesser 9 mm) einer mit der sensitiven Indikatorhefe beimpften MBA-Platte (2x10⁵ Zellen/ml) einpipettiert. Nach dreitägiger Bebrütung der Platten bei 20°C wurden die deutlich sichtbaren Hemmhöfe ausgemessen. Hierbei zeigte sich, daß zwischen dem Hemmhofdurchmesser und dem Logarithmus der Toxinkonzentration eine lineare Beziehung besteht. Einem (um den Lochdurchmesser korrigierten) Hemmhofdurchmesser von 20 mm wurde eine willkürliche Toxinaktivität von 1x10⁴ Einheiten/ml zugeordnet.

Die Reinigung des konzentrierten WICALTINS erfolgte entweder durch Kationenaustausch-Chromatographie an Bioscale-S (FPLC) oder durch Affinitäts-Chromatographie an einer epoxyaktivierten Sepharose-6B-Matrix (Fa. Pharmacia), an die zuvor das pflanzliche β-1,5-D-Glukan Pustulan gekoppelt wurde. Das auf diese Weise in seiner spezifischen Aktivität 625-fach angereicherte Toxinpräparat (Tabelle 1) war gelelektrophoretisch rein und zeigte nach SDS-PAGE (im 10-22%-igen Gradientengel) nur noch eine einzelne Bande bei etwa 37 kDa, die gleichermaßen mit Coomassie-Blau (Proteinfärbung) und Perjodsäure-Schiffs-Reagenz (PAS; Kohlenhydratfärbung) nachweisbar war. Die positive PAS-Färbung deutet auf eine potentielle N-Glykosylierung des anti-*Candida*-Toxins WICALTIN hin. Durch Behandlung des gereinigten Toxins mit Endoglykosidase-H konnte bestätigt werden, daß WICALTIN einen N-glykosidisch verknüpften Kohlenhydratanteil von etwa 3 kDa besitzt, der in dieser Größe in Hefe ebenfalls auf eine einzige N-Glykosylierungsstelle im Proteintoxin hindeutet. Da das deglykosylierte WICALTIN eine deutlich eingeschränkte Toxizität aufweist, kann gefolgert werden, daß der Kohlenhydratanteil von WICALTIN vermutlich für die Bindung an die sensitive Zielzelle notwendig ist und dadurch indirekt die biologische Aktivität des Toxins beeinflusst.

Tabelle 1: Anreicherung von WICALTIN aus dem Kulturüberstand von *Williopsis californica* [UF, Ultrafiltration]

Präparat	Volumen [ml]	Gesamtprotein [mg]	Gesamt-Toxinaktivität [E]	Spezifische Toxinaktivität [E/mg]	Aktivitätsausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Kulturüberstand UF-	10000	24600	$7,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^1$	100	1
Retentat lyophil.	50	162	$6,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^3$	80	122
Dialysat Bio-Scale	25	45,8	$3,1 \times 10^5$	$6,8 \times 10^3$	39	213
S (Kationenaustausch)	64	1,28	$2,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	3,2	625

Beispiel 2:

Bestimmung der NH₂-terminalen Aminosäuresequenz von WICALTIN und Nachweis einer enzymatischen β -1,3-Glucanase-Aktivität

Durch N-terminale Aminosäuresequenzierung des gereinigten Killertoxins wurden die ersten zehn Aminosäuren bestimmt. Wie aus Figur 1 zu erkennen ist, weist der N-Terminus von WICALTIN eine signifikante Homologie zum Aminoterminal der von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kodierten Endo- β -1,3-Glucanase auf.

Aufgrund der ermittelten Homologie von WICALTIN zu Bgl2 wurde untersucht, ob im ungereinigten Toxinpräparat sowie im gereinigten Toxinpräparat eine Glucanase-Aktivität nachweisbar ist. Sowohl im enzymatischen Test mit dem β -1,3-D-Glucan

Beispiel 4:

Wirkungs- und Abtötungsspektren von WICALTIN

Im Agardiffusionstest zeigte das gereinigte *W. californica* Toxin WICALTIN eine ausgeprägte Toxizität gegen die in Tabelle 2 dargestellten Hefen. Mit Ausnahme von drei Stämmen der Hefe *Candida krusei* wurden alle 22 getesteten, klinischen Patientenisolat sowie alle weiteren Kontrollstämme humanpathogener *Candida*-Spezies effektiv durch WICALTIN abgetötet. Mit 14 toxinsensitiven Hefearten aus verschiedenen Gattungen zeigt WICALTIN ein für Killertoxine ungewöhnlich breites Wirkungsspektrum.

Tabelle 2: Wirkungsspektrum von WICALTIN auf pathogene und apathogene Hefen unterschiedlicher Gattungen. Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA; pH 4,7) gegen gereinigtes WICALTIN getestet. Die applizierte Toxinaktivität betrug in allen Fällen 1×10^6 E/ml. Der Stamm *C. tropicalis* (Patientennummer 541965) stammte von dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik Mainz.

Hefestamm	Phänotyp	Hemmhofdurchmesser [mm]
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	S	11
<i>C. glabrata</i> NCYC 388	S	12
<i>C. krusei</i> 185	R	0
<i>C. tropicalis</i> Patientennummer 541965	S	11
<i>Debaryomyces hansenii</i> 223	S	16
<i>Hanseniaspora uvarum</i> ATCC 64295	R	0
<i>Hasegawaea japonica</i> var. <i>Versatilis</i> 191	R	0
<i>Cluyveromyces lactis</i> CBS 2359/152	S	22

Laminarin als Substrat als Fluoreszenztest mit 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Glucosid (MUC) als Substrat in den WICALTIN-Präparaten eine deutliche β -1,3-D-Glucanaseaktivität nachgewiesen werden; das ebenfalls getestete β -1,6-D-Glucan Pustulan wurde durch WICALTIN nicht hydrolysiert.

Beispiel 3:

Überlebensraten WICALTIN-behandelter Hefezellen in Gegenwart und Abwesenheit von Zellwand-Glukanen: Kompetitionsanalysen

Sensitive Hefezellen des Stammes *S. cerevisiae* 192.2d, die in YEPD-Flüssigmedium (pH 4,7) bei 20°C in Gegenwart von 1×10^6 E/ml gereinigtem WICALTIN kultiviert werden, zeigten die in Figur 2 dargestellte Abtötungskinetik. Durch Zusatz des pflanzlichen β -1,6-D-Glukans Pustulan konnte die Überlebensrate toxinbehandelter Hefezellen signifikant gesteigert werden und führte in Konzentrationen von 10 mg/ml zu einer vollständigen Aufhebung der WICALTIN-Toxizität. Im Unterschied zu Pustulan war das β -1,3-D-Glucan Laminarin nicht in der Lage, die Überlebensrate der toxinbehandelten Hefen zu steigern (Figur 2). Die dargestellten Befunde lassen somit darauf schließen, daß die Wirkung von WICALTIN eine Bindung an β -1,6-D-Glukane erfordert, die als primäre Andockstellen (Toxinrezeptoren) der Hefezellwand fungieren. In Übereinstimmung hiermit konnte gezeigt werden, daß sich Hefen mit einer Deletion im chromosomalen *KRE1*-Genlocus toxinresistent verhalten und nach Retransformation mit einem *KRE1*-tragenden episomalen Vektor wieder toxinsensitiv werden (Figur 3). In *kre1* Mutanten beruht die Toxinresistenz auf einem deutlich verringerten β -1,6-D-Glukangehalt und einer dadurch bedingten Verringerung der zur letalen Wirkung notwendigen Toxinbindung an die Hefezelloberfläche.

<i>K. marxianus</i> C 8,1	R	0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> KJ31 B6	S	8
<i>Pichia anomala</i> 245	S	17
<i>P. farinosa</i> 258	R	0
<i>P. jadinii</i> 251	S	6
<i>P. kluyveri</i> ATCC 64301	R	0
<i>P. membranaefaciens</i> NCYC 333	R	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 192.2d	S	30
381	S	23
ATCC 42017 (K1-Superkiller)	S	19
NCYC 738 (K2-Killer)	S	14
452 (= NCYC 1006)	S	16
<i>Saccharomyces ludwigii</i> 240	R	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> CBS1042	R	0
<i>Sporothrix spec.</i> 1129	S	11
<i>Torulospira delbrueckii</i> 208	S	18
<i>T. pretoriensis</i> 186	S	10
<i>Yarrowia lipolytica</i> 271	S	8
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> 412	S	23

Beispiel 5:

Klonierung, Sequenzierung und molekulare Charakterisierung des WICALTIN-codierenden WCT-Gens der Hefe *W. californica* Stamm 3/57 (DSM 12865)

Aufbauend auf der N-terminalen Aminosäuresequenz von WICALTIN wurden spezifische DNA-Oligonukleotide hergestellt, die zur Identifizierung und Klonierung sowie zur molekularbiologischen Charakterisierung des chromosomal lokalisierten Toxin-gens WCT führten. Die DNA-Sequenz von WCT (SEQ ID No. 1) zeigt einen einzel-

nen offenen Leserahmen, der für ein potentiell N-glykosyliertes Protein aus 309 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 10 kDa kodiert. Untersuchungen zur Wirkung des WCT-kodierten Killertoxins zeigten deutlich, daß es sich bei WICALTIN um ein für Hefen äußerst toxisches Glykoprotein handelt, dessen primäres 'target' die in Hefen vorkommenden Zellwand- β -1,3-D-Glukane sind. Seine selektive Toxizität auf Hefen und Pilze beruht darauf, daß WICALTIN in der sensitiven Zielzelle die Struktur und/oder Integrität der Zellwand zerstört und Hefen somit an ihrer empfindlichsten Stelle angreift und letztlich auch abtötet.

Beispiel 6:

Anreicherung und Reinigung des Virustoxins ZYGOCIN aus Kulturüberständen der Killerhefe *Z. bailii* Stamm 412 (DSM 12864)

Das viruskodierte Killertoxin ZYGOCIN der Hefe *Z. bailii* Stamm 412 wurde entsprechend der von Radler *et al.* (1993) beschriebenen Methode aus dem Kulturüberstand der Killerhefe isoliert, durch Ultrafiltration konzentriert und schließlich durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Die in vorliegender Studie entwickelte Reinigung von ZYGOCIN in nur einem Schritt nutzt die natürliche Affinität des Toxins zu Zellwand-Mannoproteinen sensitiver Hefen. Das nach einer von Schmitt & Radler (1997) beschriebenen Methode aus *S. cerevisiae* Stamm 192.2d isolierte und teilgereinigte Mannoprotein wurde kovalent an eine epoxyaktivierte Sepharose-6B-Matrix (Fa. Pharmacia) gekoppelt und mittels FPLC zur säulenchromatographischen Toxinreinigung eingesetzt. Nach SDS-PAGE zeigte das in dieser Weise gereinigte, biologisch hoch aktive ZYGOCIN eine einzelne Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 10 kDa (Figur 4).

Beispiel 8:

Klonierung und Sequenzierung des ZYGOCIN-codierenden ZBT-Gens (ZBT,) der Hefe *Z. bailii* Stamm 412 (DSM 12864)

Die cDNA-Synthese des toxcodierenden Doppelstrang-RNA-Genoms der Killerhefe *Z. bailii* 412 erfolgte in Anlehnung an die von Schmitt (1995) beschriebene Methode mit gereinigter, durch Methylquecksilberhydroxid denaturierter M-dsRNA und verschiedenen Hexanukleotiden als 'Primern'. Nach Ligation in den linearisierten Vektor pUC18, Transformation in *E. coli* und Isolierung der rekombinanten Plasmide konnten mehrere cDNA-Klone identifiziert und sequenziert werden. Die cDNA-Sequenz des ZYGOCIN-codierenden Leserasters (SEQ ID No 2) enthält die genetische Information für ein Vorläuferprotein (Pro-Toxin) aus 238 Aminosäuren, welches in Aminosäureposition RR¹³⁸ eine potentielle Kex2-Endopeptidase-Spaltstelle trägt. Durch die *in vivo* im späten Golgi-Stadium erfolgende Kex2-vermittelte Pro-ZYGOCIN-Prozessierung entsteht das biologisch aktive ZYGOCIN, dessen Molekulargewicht (10 kDa; 99 Aminosäuren) und N-terminale Aminosäuresequenz exakt mit den für das gereinigte ZYGOCIN ermittelten Werten übereinstimmen.

Eine heterologe Expression der ZBT-cDNA in der Hefe *S. cerevisiae* führte aufgrund der Toxizität von ZYGOCIN dazu, daß sich die transformierten Hefen durch ihr eigenes Toxin abtöteten. In Zukunft wird eine heterologe ZYGOCIN-Expression in der toxinresistenten Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* angestrebt, da wie am Beispiel des viralen K28-Toxins bereits gezeigt werden konnte, daß sich die Spalthefe besonders gut zur Expression und Sekretion von Fremdproteinen eignet.

Beispiel 9:

Expression der Toxingene WCT und ZBT in transgenen Pflanzen

Da die beschriebenen Killertoxine WICALTIN und ZYGOCIN ein breites Wirkungsspektrum besitzen und auch pflanzenpathogene Hefen und Pilze abtöten, sollte es möglich sein transgene Pflanzen zu konstruieren, die sich beispielsweise gegen-

Beispiel 7:

Wirkungs- und Abtötungsspektrum von ZYGOCIN

Das im Agardiffusionstest bestimmte Wirkungsspektrum des viralen ZYGOCINS der Hefe *Z. bailii* 412 (DSM 12864) umfaßt pathogene und apathogene Hefegattungen, von denen *Candida albicans* und *Sporothrix schenckii* als Krankheitserreger bei Mensch und Tier, und *Ustilago maydis* und *Debaryomyces hansenii* als Schadhefen in der Landwirtschaft und im Lebensmittelbereich gefürchtet sind (Tab. 3).

Tabelle 3: Wirkungsspektrum von ZYGOCIN auf pathogene und apathogene Hefen unterschiedlicher Gattungen. Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA; pH 4,5) gegen ein ZYGOCIN-Präparat mit einer Aktivität von 1×10^4 E/ml getestet.

ZYGOCIN-sensitive Hefen	Relativer Grad der Sensitivität
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++
<i>Candida albicans</i>	+
<i>Candida krusei</i>	++
<i>Candida glabrata</i>	++
<i>Candida vini</i>	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	++
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+
<i>Ustilago maydis</i>	++
<i>Debaryomyces hansenii</i>	++
<i>Pichia anomala</i>	++
<i>Pichia jadinii</i>	+
<i>Pichia membranefaciens</i>	+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	++

über einer Infektion mit dem Mais-pathogenen Erreger *Ustilago maydis* resistent verhalten. Ähnliche Versuche wurden bereits an Tabak-Pflanzen durchgeführt, die durch heterologe Expression des natürlicherweise viral kodierten Killertoxins KP4 von *U. maydis* in der Lage waren, das betreffende Killertoxin zu sezernieren und dadurch einen spezifischen Schutz gegen Infektionen mit bestimmten phytopathogenen Stämmen von *U. maydis* aufbauten (Park *et al.*, 1996; Kinal *et al.*, 1995; Bevan, 1984). Aufbauend auf kommerziell erhältlichen Transformationssystemen, die auf modifizierten Derivaten des natürlichen Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* beruhen, können die von uns klonierten Toxingene WCT und ZBT in sogenannte bidirektionale pBI-Vektoren (Fa. CLONTECH) einkloniert und zur Herstellung transgener Pflanzen eingesetzt werden. Die betreffenden Toxingene WCT und ZBT werden hierzu unter Transkriptionskontrolle des starken Blumenkohl-Mosaikvirus-Promotors (CaMV-P) gebracht. Der Aufbau der zu konstruierenden Vektoren ist in Figur 5 schematisch dargestellt.

Beispiel 10:

Heterologe Expression des WICALTIN-kodierenden WCT-Gens der Hefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865) in *S. cerevisiae*

Zur heterologen Expression des WCT-Gens in der Hefe *S. cerevisiae* wurde das WICALTIN-kodierende WCT-Gen als 930 bp EcoRI/SmaI-Fragment in den allgemein erhältlichen 2 μ Vektor pYX242 einkloniert. Der resultierende Vektor pSTH2 (Figur 6) enthält das Toxinogen unter Transkriptionskontrolle des hefeeigenen Triose-Phosphat-Isomerase-Promotors (TPI) und ermöglicht dadurch nach Transformation in Hefe (*S. cerevisiae*) eine konstitutive Expression von WICALTIN. Eine gelelektrophoretische Analyse des Kulturüberstandes der auf diese Weise erhaltenen Hefetransformanten zeigte, daß das rekombinante WICALTIN in das Außenmedium sezerniert wird und eine dem homologen WICALTIN (aus Wildtyp-Stamm DSM 12865) entsprechende β -1,3-D-Glukanase-Aktivität besitzt (Figur 6).

Beispiel 11:

Versuche zur heterologen Expression von WICALTIN und ZYGOCIN in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*

Da sich die Spalthefe sowohl als intakte Zelle als auch als zelwandfreier Sphäroplast resistent gegen WICALTIN und ZYGOCIN verhält, ist sie als Wirt zur heterologen Expression der betreffenden Toxine geeignet. Um zu gewährleisten, daß die rekombinanten Toxine von der Spalthefe nicht nur exprimiert, sondern gleichzeitig auch in den intrazellulären Sekretionsweg eingeschleust und damit in das Außenmedium sezerniert werden, wurde ein Vektor konstruiert (pTZa_h; Figur 7), der ein in *S. pombe* funktionelles Sekretions- und Prozessierungs-Signal (S/P) trägt, welches aus der cDNA des viralen K28-Präprotoxins der Hefe *S. cerevisiae* stammt [Vgl. Schmitt, 1995; Schmitt & Tipper, 1995]. Das Sekretions- und Prozessierungssignal gewährleistet, daß das jeweils 'in-frame' nachgeschaltete Fremdprotein in der Spalthefe in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums importiert und damit in den Sekretionsweg der Hefe eingeschleust wird. Durch die am C-Terminus der S/P-Region vorhandene Kex2p-Spaltstelle wird das gewünschte Fremdprotein in einem späten Golgi-Kompartiment durch die hefeeigene Kex2p-Endopeptidase von seinem intrazellulären 'Transport-Vehikel' abgespalten und kann schließlich als biologisch aktives Protein (ZYGOCIN und/oder WICALTIN) in das Außenmedium sezerniert werden.

Beispiel 12:

Vergleichende biologische Aktivitäten von gereinigtem WICALTIN und der toxischen Antimycotika Clotrimazol und Miconazol

Das gereinigte WICALTIN ein breites Wirkungsspektrum besitzt und auch hummogene Hefen und/oder Pilze effektiv abtötet, kommt ihm eine Bedeutung als potientes Antimycotikum zu. Daher wurden mit WICALTIN vergleichende Studien zu den derzeit sehr häufig eingesetzten topischen Antimycotika Clotrimazol und Miconazol durchgeführt. Zunächst wurde die toxische Wirkung von Clotrimazol und

Miconazol im MBA-Agardiffusionstest gegen *Sporothrix spec.* als Indikatorhefe getestet. Hierzu wurde Clotrimazol in einer Konzentration von 10 mg/ml in Ethanol (96%) gelöst; diese Stammlösung wurde mit H₂O verdünnt und in Konzentrationen von 0,1 bis 10 mg/ml zu je 100 µl im MBA-Test eingesetzt. Der Hemmhofdurchmesser lag bei einer eingesetzten Menge von 10-50 µg Clotrimazol zwischen 12 und 32 mm. Von Miconazol wurde eine Stammlösung von 100 µg/ml in DMSO (100%) hergestellt, die in gleicher Weise wie Clotrimazol im MBA-Test auf biologische Aktivität gegen *Sporothrix spec.* untersucht wurde. Der Einsatz von 0,08-0,3 µg Miconazol führte im 'Bioassay' zu Hemmhöfen zwischen 22 und 36 mm. Die biologischen Aktivitäten von 10 µg Clotrimazol bzw. von 0,08 µg Miconazol entsprechen somit der Toxizität von 2 µg gereinigtem WICALTIN. Ein auf das Molekulargewicht der drei getesteten Verbindungen basierender Vergleich zeigt, daß WICALTIN bereits in einer Konzentration von 0,07 pmol die gleiche Aktivität zeigt wie 0,2 pmol Miconazol und 29 pmol Clotrimazol; bei WICALTIN handelt es sich somit um ein überaus wirksames Antimycotikum (Figur 8).

Beispiel 13:

Nachweis des WICALTIN-kodierenden WCT-Gens der Hefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865) durch Southern-Hybridisierung mit genspezifischen DNA-Sonde.

Zum Nachweis, daß die Nukleinsäure nach SEQ ID No. 1 zur Herstellung einer WICALTIN-spezifischen DNA-Sonde für eine anschließende Southern-Hybridisierung eingesetzt werden kann, wurde eine DIG-markierte, 930 bp lange DNA-Sonde zum Nachweis des in den Vektor pSTH1 einklonierten WCT-Gens eingesetzt. Der konstruierte Vektor pSTH1 repräsentiert ein Derivat des allgemein erhältlichen, prokaryotischen Klonierungsvektors pBR322.

Die in Figur 9 dargestellte Agarosegelelektrophorese und der entsprechende Southern-Blot zeigen zweifelsfrei, daß mit der hergestellten Nukleinsäuresonde, das WICALTIN-kodierende WCT-Gen nachgewiesen werden kann.

Beispiel 14:

Northern-Blot Analyse zum Nachweis einer Transkriptions-Induktion des WICALTIN-kodierenden WCT-Gens der Hefe *Williopsis californica* 3/57 (DSM 12865) durch β-1,3-D-Glukane

Zum Nachweis einer β-1,3-D-Glukan-induzierten WCT-Transkription wurde der Hefestamm DSM 12865 in 300 ml BAVC-Medium bzw. in BAVC-Medium mit Zusatz von 100 µg/ml pflanzlichen β-1,3-D-Glukans Laminarin für 48 h bei 20°C und leichtem Rühren (100 Upm) kultiviert und nach unterschiedlichen Zeiten zur Präparation der RNA eingesetzt. Alle Proben (10 ml) wurden vor der RNA-Isolierung auf eine gleiche Zellzahl von $1,8 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt und in denaturierenden Agarose-Formaldehydgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Wie aus Figur 10 zu erkennen ist, konnte sowohl unter nicht-induzierenden Bedingungen (BAVC-Medium ohne Zusatz) als auch im Laminarin-supplementierten BAVC-Medium für das WCT-Transkript eine Größe von 1.100 Basen nachgewiesen werden. Ohne Glukanzusatz wurde gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase (nach 19 h) eine maximale WCT-Expression erreicht; die in der stationären Wachstumsphase deutlich schwächer werdenden Hybridisierungssignale deuten auf eine abgeschwächte Transkription hin. Unter induzierenden Kulturbedingungen (in Gegenwart von Laminarin) zeigte das WCT-Transkript nach 10 h eine deutlich höhere Intensität als in der nicht-induzierten Kultur, so daß gefolgert werden kann, daß die Transkription des WICALTIN-kodierenden WCT-Gens durch Zusatz von β-1,3-D-Glukanen induziert werden kann.

Anhang Beispiele:

Verwendete Medien und Lösungen in den Beispielen:

a.) BAVC-Medium

Glucose 50 g/l
D,L-Malat 20 g/l
tri-Natriumcitrat 0,5 g/l

(NH₄)₂SO₄ 1,5 g/l
MgSO₄ 1,0 g/l
CaCl₂ 0,5 g/l
myo-Inositol 0,04 g/l
Aminosäure-Stammlösung (10 x) 200 ml/l
Spurenelemente-Stammlösung (100 x) 10 ml/l
Vitamin-Stammlösung (100 x) 20 ml/l

Mit:

b.) Aminosäure-Stammlösung (10 x)

Alanin 0,75 g/l
Argininmonohydrochlorid 3,5 g/l
Asparaginsäure 0,5 g/l
Glutaminsäure 3 g/l
Histidinmonohydrochlorid 0,2 g/l
Methionin 0,4 g/l
Serin 0,5 g/l
Threonin 2 g/l
Tryptophan 0,4 g/l

c.) Spurenelement-Stammlösung (100 x)

Borsäure 200 mg/l
FeCl₃ x 6 H₂O 200 mg/l
ZnSO₄ x 7 H₂O 200 mg/l
AlCl₃ 200 mg/l
CuSO₄ x 5 H₂O 100 mg/l
Na₂MoO₄ x 2 H₂O 100 mg/l
Li₂SO₄ x H₂O 100 mg/l
KJ 100 mg/l
Kaliumhydrogentartrat 2 g/l

d.) Vitamin-Stammlösung (100 x)

4-Aminobenzoessäure 20 mg/l

Biotin 2 mg/l

Folsäure 2 mg/l

Nicotinsäure 100 mg/l

Pyridoxolhydrochlorid 100 mg/l

Riboflavin 50 mg/l

Thiaminiumdichlorid 50 mg/l

Ca-D-Panthenat 100 mg/l

Biotin: in 5 g KH_2PO_4 /50 ml Aqua dest. lösen.

Folsäure: in 50 ml Aqua dest. unter Zusatz von einigen Tropfen verdünnter NaOH lösen.

Riboflavin: in 500 ml Aqua dest. und einigen Tropfen HCl unter Erwärmen lösen.

Die übrigen Vitamine sind in wenig Aqua dest. löslich.

Der pH-Wert des BAVC-Mediums wurde durch Zusatz von KOH auf pH 4,7 eingestellt. Glucose und Stammlösungen wurden getrennt voneinander sterilisiert. Aminosäure-, Vitamin- und Spurenelement-Stammlösungen wurden 20 Minuten im störenden Dampf bei 100°C sterilisiert und danach dem autoklavierten BAVC-Medium zugesetzt.

Figuren und die wichtigsten Sequenzen

SEQ ID No. 1: DNA- und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des WCT-kodierten Proteintoxins WICALTIN der Hefe *Williopsis californica* Stamm 3/57.

SEQ ID No. 2: cDNA- und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des ZBT-kodierten Proteintoxins ZYGOCIN der Hefe *Zygosaccharomyces bailii*

Figuren 7 und 8: terminale Aminosäuresequenzen des *W. californica* Toxins WICALTIN und der Endo- β -1,3-Glucanase Bgl2 der Hefe *S. cerevisiae*. Im Fettdruck ist die einzige Abweichung der ansonsten identischen Teilsequenzen dargestellt (Bgl2p-Sequenz nach Klebl & Tanner, 1989)

Promotors und ermöglicht dadurch nach Transformation in *S. cerevisiae* eine starke und konstitutive Expression von WICALTIN.

(B) Gelelektrophoretische Analyse (SDS-PAGE; 10-22,5 %-iges Gradientengel) konzentrierter Kulturüberstände von *S. cerevisiae* nach Transformation mit dem konstruierten WICALTIN-Expressionsvektor pSTH2 (Spur 1) und dem Grundvektor pYX242 (Spur 2). Das in *S. cerevisiae* heterolog exprimierte WICALTIN ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Figuren 9 und 10: Nachweis einer extrazellulären β -1,3-D-Glucanase-Aktivität der Hefe *S. cerevisiae* nach Transformation mit dem WICALTIN-exprimierenden Hefektor pSTH2. Zur Messung der Exo- β -1,3-D-Glucanase-Aktivität wurden die auf leucinfreiem SC-Agar kultivierten Hefekolonien mit 0,04% 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucosid (MUG) in 50 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5,2) besprüht. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurden die Agarplatten mit UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) bestrahlt. Die Glucanase-Aktivität wurde aufgrund der MUG-Hydrolyse durch Fluoreszenz nachgewiesen.

[Erklärungen: 1 und 4, *S. cerevisiae* transformiert mit einem Vektor (pEP-WCT), der das WICALTIN-kodierende WCT-Gen unter dessen eigenem Promotor exprimiert; 2, Wildtyphefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865); 3, Wildtyphefe *W. californica* 3/111; 5, *S. cerevisiae* nach Transformation mit dem WICALTIN exprimierenden Vektor pYX-WCT; 6, *S. cerevisiae* transformiert mit dem Grundvektor pYX242 (ohne Toxingen)]

Figure 7: Schema des strukturellen Aufbaus des Vektors pTZa₂ zur heterologen Expression und Sekretion von Fremdproteinen (insbesondere von WICALTIN und ZYGOCIN) in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*.

[Erklärungen: P_{met}, T_{met}, Transkriptions-Promotor und -Terminator des Thiamin-regulierten *nmt1* Gens der Spalthefe *S. pombe*; S/P, Sekretions- und Prozessierungssequenz des viralen K28-Präprotoxins der Sproßhefe *S. cerevisiae*; *ars1*, autonom replizierende Sequenz aus Chromosom 1 der Spalthefe; *leu2*, Leucin-2-Markergen zur Selektion Leucin-prototropher Transformanten von *S. pombe*]

Figure 8: Vergleichende biologische Aktivitäten von gereinigtem WICALTIN, Clotrimazol und Miconazol; die angegebenen molaren Mengen erzeugen im 'Bioassay'

Figure 2: Abtötungskinetik WICALTIN-behandelter Zellen der sensitiven Hefe *S. cerevisiae* 192.2d in Gegenwart (a) und Abwesenheit (b) der β -D-Glukane Laminarin (L) und Pustulan (P). Die getestete Toxin hatte eine Gesamtkonzentration von $4,0 \times 10^4$ E/ml bei einer spezifischen Aktivität von $4,2 \times 10^5$ E/mg Protein.

Figure 3: Agardiffusionstest zum Nachweis einer WICALTIN-Sensitivität/Resistenz in *Kre1*⁺ und *Kre1*⁻ Stämmen der Hefe *S. cerevisiae*. Durch Transformation der WICALTIN-resistenten *kre1* Nullmutante *S. cerevisiae* SEY6210[Δ kre1] mit dem *KRE1*-tragenden Vektor pPGK[KRE1] wird die volle WICALTIN-Sensitivität wiederhergestellt.

Figure 4: (A) Gelelektrophoretische Analyse (SDS-PAGE) des von der Hefe *Z. bailii* Stamm 412 (DSM 12864) produzierten und sezernierten ZYGOCINS nach Affinitäts-Chromatographie an Mannoprotein-Sepharose. (B) Agardiffusionstest zum Nachweis der biologischen Aktivität des gereinigten Killertoxins ZYGOCIN.

Figure 5: Schematischer Aufbau eines ZBT- bzw. WCT-tragenden Expressionsvektors zur Herstellung transgener Pflanzen.

[Erklärungen: RB, LB: 'right and left border'-Sequenzen des natürlichen Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens*; CaMV-P: 35S Promotor des Blumenkohl-Mosaikvirus; NOS-P, NOS-T: Transkriptions-Promotor und -Terminator der Nopalinsynthase; kan^r: Kanamycin-Resistenzgen aus *Streptococcus* zur Selektion in *E. coli*; NPT-II: Neomycin-Phosphotransferasagen aus dem Transposon Tn5 zur Selektion in Pflanze].

Figure 6: (A) Partielle Restriktionskarte des episomalen Vektors pSTH2 zur heterologen Expression des WICALTIN-kodierenden Toxingens WCT in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Vektor pSTH2 ist ein konstruiertes Plasmid auf der Basis des kommerziell erhältlichen 2 μ Multi-Copy-Vektors pYX242, in welches das WCT-Gen aus Stamm DSM 12865 als 930 bp EcoRI/SmaI-Fragment einkloniert wurde. Das betreffende Toxingen steht unter Transkriptionskontrolle des hefeeigenen *TPI*-

(Agardiffusionstest) gegen die sensitive Indikatorhefe *Sporothrix spec.* einen Hemmhof-Durchmesser von 12 mm.

Figure 9: Nachweis des in pSTH1 (pBR322-Derivat) einklonierten WICALTIN-kodierenden WCT-Gens der Hefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865) durch Agarose-gelelektrophorese (A) und Southern-Hybridisierung mit einer DIG-markierten WCT-Sonde (B).

[Erklärungen: M, DIG-markierter DNA-Längenstandard II; Spur 1, pSTH1 restringiert mit EcoRI und SmaI; Spur 2, DNA-Marker 'Smart-Ladder']

Figure 10: Northern-Analyse zur Transkriptions-Induktion des WICALTIN-kodierenden WCT-Gens der Hefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865) unter nicht-induzierenden Kulturbedingungen in BAVC-Medium (A) und unter induzierenden Bedingungen in BAVC-Medium mit Zusatz von 0,03 % Laminarin (B). Die elektrophoretische Auftrennung der aus Stamm DSM 12865 isolierten Gesamt-RNA erfolgte in einem denaturierenden Agarose/Formaldehyd-Gel bei konstanter Spannung (7 V/cm). Die RNA wurde auf einer Nylonmembran gegen eine WICALTIN-spezifische, DIG-markierte DNA-Sonde (630 bp) hybridisiert und durch Chemilumineszenz detektiert.

[Erklärungen: M, DIG-markierter RNA-Längenstandard I; Spuren 1-8 entsprechen den Zeitpunkten der Probennahme zur Isolierung der Gesamt-RNA: Spur 1, 10 h; Spur 2, 15 h; Spur 3, 19 h; Spur 4, 24 h; Spur 5, 33 h; Spur 6, 38 h; Spur 7, 43 h; Spur 8, 48 h]

Im Text verwendete Abkürzungen:

WCT	<i>Williopsis californica</i> Toxin
ZBT	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> Toxin
ZYGOCIN	Eigenname; sezerniertes Toxin aus DSM 12864
WICALTIN	Eigenname; sezerniertes Toxin aus DSM 12865

Literaturachweise

- Anaissie, E. (1992). Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin. Infect. Dis.* 14:43-51.
- Bevan, E.A. & M. Makower (1983). The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. Int. Congr. Genet.* XI:1202-1203.
- Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8720.
- Bussey, H. (1991). K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol. Microbiol.* 5:2339-2343.
- Cameron, M.L., Schell, W.A., Bruch, S., Bartlett, J.A., Waskin, H.A. & J.R. Perfect (1993). Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2449-2453.
- Chavenet, P., Lopez, J., Grappin, M., Bannin, A., Duomg, M., Waldner, A., Buisson, M., Camerlynck, P. & H. Portier (1994). Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and in vitro-in vivo correlation in HIV-infected patients. *AIDS* 8:945-950.
- Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D. & D.Y. Thomas (1991). Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol. Gen. Genet.* 227:127-136.
- Hanes, S.D., Burn, V.E., Strley, S.L., Tipper, D.J. & D.Y. Thomas (1986). Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1675-1679.
- Hector, R.F. (1993). Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:1-21.
- Hodgson, V.J., Button, D. & G.M. Walker (1995). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol.* 141:2003-2012.
- Komijama, T., Shirai, T., Kamei, H., Furuichi, Y. & Y. Ohta (1998). Action properties of HY1 killer toxin from *Williopsis saturnus* var. *saturus*, and antibiotics, aculeacin A and paucicandin B. *Biol. Pharm. Bull.* 21:1013-1019.
- Kurz, M.B. (1998). New antifungal drug targets: a vision for the future. *ASM News* 64:31-39.
- Levy, J.A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infections. *Microbiol. Rev.* 57:183-289.
- Maenza, J.R., Keruly, J.C., Moore, R.D., Chaisson, R.E., Merz, W.G. & J.E. Galant (1996). Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Infect. Dis.* 173:219-225.
- McCracken, D.A., Martin, V.J., Stark, M.J.R. & P.L. Bolen (1994). The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia accaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiol.* 140:425-431.
- Meunier, F., Aoun, M. & N. Bitar (1992). Candidemia in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 14:120-125.
- Mrsa, V., Klebl, F. & W. Tanner (1993). Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo- β -1,3-glucanase. *J. Bacteriol.* 175:2102-2106.
- Neuhausen, F. & M.J. Schmitt (1996). Transgenic expression of a toxin-coding killer virus of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a possible function of "cryptic" mycoviruses in the evolution of their hosts. In: Transgenic Organisms and Biosafety: Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA, and Expression of Transgenes, Schmidt, E.R. & Th. Hankeln (eds), 117-124. Springer-Verlag.
- Park, C.M., Banerjee, N., Koltin, Y. & J.A. Bruenn (1996). The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin. *Mol. Microbiol.* 20:957-963.
- Park, C.M., Berry, J.O. & J.A. Bruenn (1996). High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 30:359-368.
- Pfaller, M.A., Chalberg, J.R., Redding, S.W., Smith, J., Farinacci, G., Fothergill, A.W. & M.G. Rinaldi (1994). Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 32:59-64.
- Pfeiffer, P., Radler, F., Caspritz, G. & H. Hänel (1988). Effect of a killer toxin of yeast on eukaryotic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1068-1069.
- Polonelli, L., Lorenzini, R., De Bernardis, F. & G. Morace (1986). Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathology* 96:103-107.
- Radler, F., Herzberger, S., Schönig, I. & P. Schwarz (1993). Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Gen. Microbiol.* 139:495-500.
- Rex, J.H., Rinaldi, M.G. & M.A. Pfaller (1995). Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1-8.
- Paravicini, G., Payton, M.A. & H. Bussey (1994). Characterization of the α -(1 \rightarrow 6)- β -glucan biosynthetic components, *Kre6p* and *Skn1p*, and genetic interactions between the *PKC1* pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell. Biol.* 127:567-579.
- Schmitt, M.J. & D.J. Tipper (1990). K28, a new double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:4807-4815.
- Schmitt, M.J. & D.J. Tipper (1992). Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast* 8:373-384.
- Schmitt, M.J. & D.J. Tipper (1995). Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an α/β heterodimeric protein toxin. *Virology* 213:341-351.
- Schmitt, M.J. & F. Neuhausen (1994). Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Zygosaccharomyces bailii* and *Hanseniaspora uvarum*. *J. Virol.* 68:1765-1772.
- Schmitt, M.J. & F. Radler (1987). Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.* 133:3347-3354.
- Schmitt, M.J. & F. Radler (1988). Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin K28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170:2192-2196.
- Schmitt, M.J. & F. Radler (1995). Mycoviren und Hefe-Killertoxine erlauben Einblicke in die Zellbiologie. *Forschungsmagazin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz* 2:86-98.
- Schmitt, M.J. & F. Radler (1996). dsRNA-Viren codieren Killertoxine bei der Hefe *Saccharomyces*. *BioEngineering* 2:30-34.

- Komijama, T., Shirai, T., Kamei, H., Furuichi, Y. & Y. Ohta (1998). Action properties of HY1 killer toxin from *Williopsis saturnus* var. *saturus*, and antibiotics, aculeacin A and paucicandin B. *Biol. Pharm. Bull.* 21:1013-1019.
- Kurz, M.B. (1998). New antifungal drug targets: a vision for the future. *ASM News* 64:31-39.
- Levy, J.A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infections. *Microbiol. Rev.* 57:183-289.
- Maenza, J.R., Keruly, J.C., Moore, R.D., Chaisson, R.E., Merz, W.G. & J.E. Galant (1996). Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Infect. Dis.* 173:219-225.
- McCracken, D.A., Martin, V.J., Stark, M.J.R. & P.L. Bolen (1994). The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia accaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiol.* 140:425-431.
- Meunier, F., Aoun, M. & N. Bitar (1992). Candidemia in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 14:120-125.
- Mrsa, V., Klebl, F. & W. Tanner (1993). Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo- β -1,3-glucanase. *J. Bacteriol.* 175:2102-2106.
- Neuhausen, F. & M.J. Schmitt (1996). Transgenic expression of a toxin-coding killer virus of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a possible function of "cryptic" mycoviruses in the evolution of their hosts. In: Transgenic Organisms and Biosafety: Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA, and Expression of Transgenes, Schmidt, E.R. & Th. Hankeln (eds), 117-124. Springer-Verlag.
- Park, C.M., Banerjee, N., Koltin, Y. & J.A. Bruenn (1996). The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin. *Mol. Microbiol.* 20:957-963.
- Park, C.M., Berry, J.O. & J.A. Bruenn (1996). High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 30:359-368.
- Pfaller, M.A., Chalberg, J.R., Redding, S.W., Smith, J., Farinacci, G., Fothergill, A.W. & M.G. Rinaldi (1994). Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 32:59-64.
- Schmitt, M.J. & G. Schemikau (1997). Construction of a cDNA-based K1/K2/K28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 35:281-285.
- Schmitt, M.J. & P. Compain (1995). Killer toxin resistant *kre12* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and biochemical evidence for a secondary K1 membrane receptor. *Arch. Microbiol.* 164:435-443.
- Schmitt, M.J. (1995). Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 246:236-246.
- Schmitt, M.J., Brendel, M., Schwarz, R. & F. Radler (1989). Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin K28. *J. Gen. Microbiol.* 135:1529-1535.
- Schmitt, M.J., Klavehn, P., Wang, J., Schönig, I. & D.J. Tipper (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiol.* 142:2655-2662.
- Schmitt, M.J., Poravou, O., Trenz, K. & K. Rehfeldt (1997). Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J. Virol.* 71:8852-8855.
- Schmitt, M.J., Poravou, O., Trenz, K. & K. Rehfeldt (1997). Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J. Virol.* 71:8852-8855.
- Schröder, J., Meinhardt, F., Rohe, M. & J. Kämper (1994). Lineare Plasmide bei Mikroorganismen - Genetische Grundlagen und potentielle Anwendungen. *BioEngineering* 10:29-39.
- Tipper, D.J. & M.J. Schmitt (1991). Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol. Microbiol.* 5:2331-2338.
- Troillet, N., Durussel, C., Bille, J., Glauser, M.P. & J.P. Chave (1993). Correlation between in vitro susceptibility of *Candida albicans* and fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12:911-915.
- Walker, G.M., McLeod, A.H. & V.J. Hodgson (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 127:213-222.
- Wickner, R.B. (1993). Double-stranded RNA virus replication and packaging. *J. Biol. Chem.* 268:3797-3800.

Wingard, J.R. (1995). Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.* 20:115-122

Patentansprüche

HOE 1999/F028

1. Proteintoxine aus *Williopsis californica* und/oder *Zygosaccharomyces bailii*.
2. Proteintoxine nach Anspruch 1, erhältlich aus DSM 12864 und/oder DSM 12865.
3. Proteintoxine nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine antimycotische und / oder fungizide Wirkung inne haben.
4. Proteintoxin nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit der Aktivität einer Glucanase.
5. Proteintoxin nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es an β -1,6-D-Glukane bindet und β -1,3-D-Glucanase- und/oder β -1,3-Glucanosyltransferase-Aktivität besitzt.
6. Nukleinsäure kodierend für eine Glucanase und/oder für ein Proteintoxin gemäß einer der Ansprüche 1-5 mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 oder SEQ ID No 2 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID No 1 oder SEQ ID No 2 Teil des Anspruchs ist.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA ist.
8. Nukleinsäure nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 von Basenposition 1 bis 950 oder SEQ ID No 2 von Basenposition 1 bis 717 ist, wobei SEQ ID No 1 oder SEQ ID No 2 Teil des Anspruchs ist.

9. Nukleinsäure nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine oder mehrere regulatorische Regionen (Promotor, 'Enhancer', Terminator) und/oder eine 3'-terminale PolyA-Sequenz und/oder eine zur intrazellulären Pro-Toxinprozessierung notwendige Kex2p-Endopeptidase-Spaltstelle und/oder eine oder mehrere potentierte N-Glykosylierungsstellen enthält.

10. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 89 erhältlich aus DSM 12864 und/oder DSM 12865.

11. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.

12. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6-10 dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.

13. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 oder SEQ ID No 2 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.

14. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Ansprüchen 1-5 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-11 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.

15. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 1-5 und 13.

16. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 7 immunisiert und gegebenenfalls die entstandenen Antikörper isoliert werden.

17. Arzneimittel enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 und gegebenenfalls pharmazeutisch annehmbare Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

18. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Mycosen, wie oberflächliche, kutane und subkutane Dermatomykosen, Schleimhaut- und Systemmykosen, besonders bevorzugt *Candida*-Mykosen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoff formuliert wird.

19. Diagnostikum enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

20. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Mycosen, wie oberflächliche, kutane und subkutane Dermatomykosen, Schleimhaut- und Systemmykosen, besonders bevorzugt *Candida*-Mykosen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger versetzt wird.

21. Test zur Identifizierung von funktionellen Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

22. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 1-5 und 13 zur Identifizierung von Interaktoren.
23. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 zum Auffinden von Varianten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Genbank mit der genannten Nukleinsäure abgesucht und die gefundene Variante isoliert wird.
24. Verwendung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13 gemäß einem der Ansprüche zur Bekämpfung von Schadhefen und Pilzen in Lebens- und Futtermittel.
25. Verfahren zur Kultivierung von DSM 12864 und DSM 12865, dadurch gekennzeichnet, daß diese in synthetischem B- und/oder BAVC-Medium kultiviert werden und anschließend mittels Ultrafiltration und Kationenaustausch-Chromatographie und/oder Affinitäts-Chromatographie an Laminarin-Sepharose und/oder Mannoprotein-Sepharose gereinigt werden.
26. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einer der Ansprüche 6-11 zur Herstellung von transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen.

Zusammenfassung

HOE 1999/F028

Neue Antimycotika und Fungizide, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft die gentechnische Bereitstellung von Proteintoxinen aus Hefen - sogenannte Killerhefen - zur Bekämpfung von human- und pflanzenpathogenen Hefen und / oder Pilzen, wobei diese selektiv abgetötet werden. Die hohe Spezifität gewährleistet den Einsatz der Proteintoxine als Antimycoticum und / oder Fungizid. Zudem können derartige Proteintoxine zum Pflanzenschutz verwendet werden.

1

SEQ ID No. 1: DNA- und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des NCT-kodierten Proteintoxins WICALTIN der Hefe *Williopsis californica* Stamm 3/57.

1 ATGCGTTTCACTACACTGCTTGCCTCGCAGGTGCCATTTCCTCAGTCCAGGCCATCGGC
M R F T T L V A L A G A I S S V Q A I G

61 CAAGTAGCTTTAACTTGGGTGTCAGGATACTCAGTCAAGTGCCTCAGAG
Q L A P N L G V K D N S G Q C K T A S E

121 CACAAGGATGACTTGTCTACCTTTTCAGGCTACACATCTAAGGTTAGAGTCTACGCTGCC
D L S T L S G Y T S K V R V Y A A

181 CAGACTGTAACTTTGCAGACTTTGGGTCAGTTGTGGAAGAGGCTGGCTTCTCATTT
S D C N T L Q T L G P V V E E A G F S F

241 TTGTTGGTATTGGCCAAACGATGATGCTCACTTCCAGGAAGCAAGAGCTTTGAAA
F V G I W P N D D A H F Q E E Q D A L K

301 ACTTATTGCCAAGATTAAAGATCCACAGTGGAGGCTTCACTGTGTGTTCTGAGGCC
T Y L P K I K R S T V E A P T V G S E A

361 TTGTATAGAGATGATGACTGCTCAAGAGTTGGCTGACAGAACTAAACTATTAGAGAG
L Y R D D M T A Q E L A D R I K T I R E

421 TTGGTTGCCACTATTGACGACTCCGAAGGTAACATATGCTGTATTCCAGTTGGTTTC
L V A T I D D S E G N S Y A G I P V G F

481 GTTGACTCTCGAAGCTTTGGTTGATGGTGCTTCTCACCAGCTATTGTTGAGGCTGAT
V D S W N V L V D G A S H P A I V E A D

541 GTTGTGTTCGCCAATGCTTCTCTTACTGGCAAGGTCAGACTCAGCAGAAGCTCGTCATAC
V V P A N A F S Y W Q G Q T Q Q N S S Y

601 TCTTCTTTGACGACATTATGCAAGCTTTGCAACCAITCAAAGCTTAAGGGTGAGACA
S F P D D I M Q A L Q T I Q T A K G S T

661 GATATCACTTTCTGGTTGGTGAGACCGGCTGGCCAAACGATGTAAGTACTCACTTTGAAGAC
D I T F W V G S T G W P T D G T H F E D

2

721 TCTGTCCCATCTGTTGAGAAATGCTCAGACCTTCTGGAAGATGCCGTCTGTGCCATTAGA
S V P S V S N A Q T P W K D A V C A I R

781 GGTGGGGTATCAATGTTATTGCTTTGAGGCTTTGACGAACTTGGAGCCAGATACC
G W G I N V I A F R A F D E A W K P D T

841 TCTGGTACCTCTGATGTGGAAGTACTGGGGTGTGTTGGGACTTAACAGCAAGTTGAAG
S G T S D V E K Y W G V W D S N S K L K

901 TATGATTGTCTGTGACTTTACCTCTTAG
Y D L S C D P T S Stopp

SEQ ID No. 2: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz des ZBT-kodierten Proteintoxins ZYOOCIN der Hefe *S. baillii*

1 ATGAAAGCAGCCCAATATTACAGCAGTATAGTAACTTATGCCAATATATACTAGT 60
M K A A Q I L T A S I V S L L P I Y T S

61 GCTAGAAACATATTAGACAGAGAATACAGCAACGAATTAATAACTGCTTTTGAGAT 120
A R N I L D R E Y T A N S L E T A P G D

121 GAAGAAATTTTACAGATTGACGTATCACATTACGTTACGTCAGTGGCGAAATTGAC 180
E S I F T D L T Y H I H V N V S G E I D

181 TCTTACTATCATAATTAGTCAATTTGTGATAACGCTCTAGCAACAAGATATTAAT 240
S Y Y H N L V N F V D N A L A N K D I N

241 AGATATATATACGCTATATTACACAGCAGACAACTATACAGAGGATGGGCTCATTGAG 300
R Y I Y A I P T Q Q T N Y T H D G L I E

301 TACTTAAATCATTACGATTACAGACTTGCAAGATATCATTACTCAGTATAATGTTAAC 360
Y L N H Y D S E T C K D I I T Q Y N V N

361 GTAGACACTAGTAAGTATAAGCACTACTACAGATCAAGCTAGACTCCACGTCGCGGA 420
V D T S N C I S N T T D Q A R L Q R R G

421 GAACCCACATGTAGTGGTGATAACTTAGCCGATAGCGATTGTTGTAAC 480
N P H C S G D N L A D T S D C C N

481 TTGGCTTATAAAGATTAAACCCCTCTCAAACCTTACAGTCATGGAATTATGTTGTCGGG 540
L A Y N K I N P S S N L Q S W N Y V V G

541 CAGTGTCTACTATGTAATGGAAAGGTATGTAGTGTGCTGACAGGCAACAG 600
Q C H Y N G R V C S G A D R Q Q

601 TTAGCTGAAAATGTATGTAACGTGTGTGAGTTAACGGTGGTGTAGCGCTTTTCTAGC 660
L A E N V C N W C Q V N G G V S A F A S

661 AGTAGTCTGCACATCCAGGTGCTTCATGAGTGATGTAGGGTTCTGCTATGCTTAG 717
S S S A H P G A C M S D V G F C Y A STOPP

Figuren:

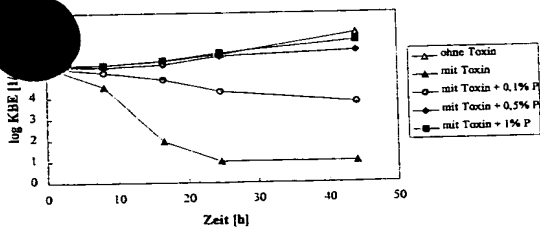
Figur 1:

WICALTIN: NH₂-Ile-Gly-Gln-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-.....

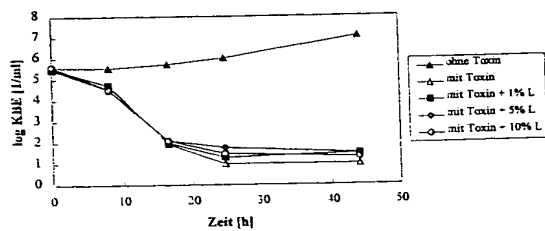
Bgl2: NH₂-Ile-Gly-Gln-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-.....

Figur 2:

2a)

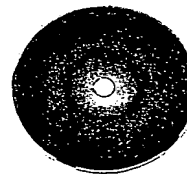


2b)

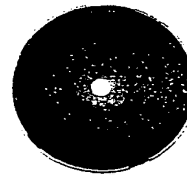


Figur 3:

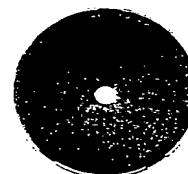
(a) *S. cerevisiae* 192.2d
(*kre1*⁺)



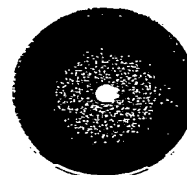
(b) *S. cerevisiae* SEY6210
(*kre1*⁺)



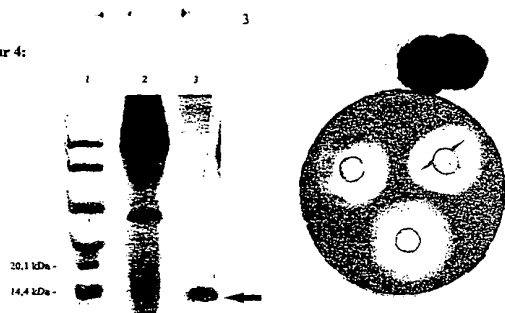
(c) *S. cerevisiae* SEY6210[Δ*kre1*]
mit pPGK[KRE1]
(*kre1*⁺)



(d) *S. cerevisiae* SEY6210[Δ*kre1*]
(*kre1*⁺)

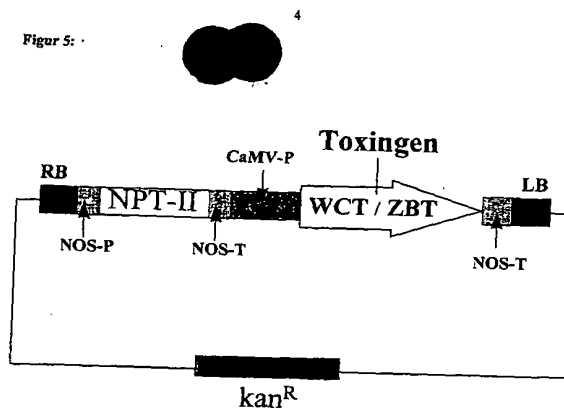


Figur 4:

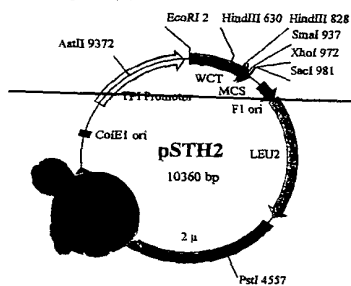


(A) SDS-PAGE von Zygocin vor und nach Affinitätschromatographie (B) MBAs-Test mit affinitätschromatographisch gereinigtem Zygocin. Als sensitiver Organismus wurde *S. cerevisiae* 172.2d verwendet. A: Eluat, 15-fach konzentriert; (1): LMW-Marker (Bio-Rad); 2: Durchlauf (im Matrix nicht gebundene Proteine); 3: Eluierter Toxin

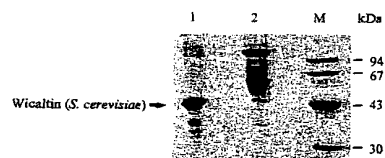
Figur 5:



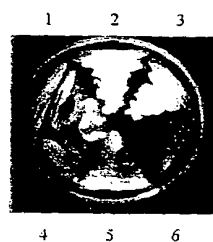
Figur 6: (A)



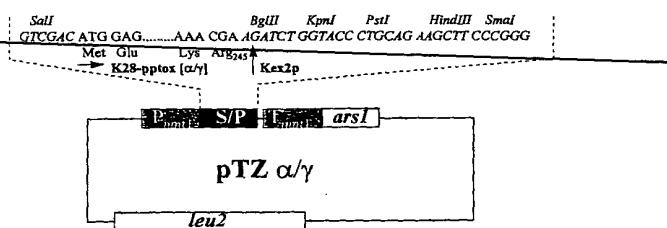
(B)



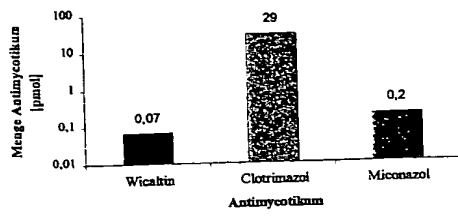
(C)



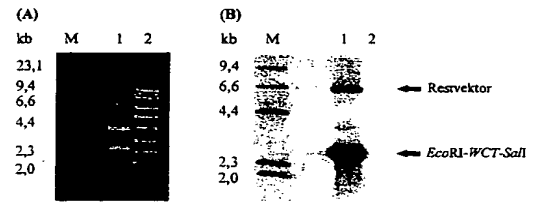
Figur 7:



Figur 8:



Figur 9:



Figur 10:

